Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 397- 413

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر - آبان ۱۴۰۱ ص.۴۱۳-۳۹۷

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Optimization of ammonium phosphate, potassium sulfate and *Saccharomyces cerevisiae* in the production of acetic acid in a batch fermentor using Response Surface Methodology

Marjan Teimorimanesh[1], Hajar Abbasi[2*]

Received: 2021.05.08
Revised: 2021.06.24
Accepted: 2021.07.05
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Teimorimanesh, M., Abbasi, H. (2022). Selection and optimization of ammonium phosphate, potassium sulfate and *Saccharomyces cerevisiae* in the production of acetic acid in a batch fermenter using Response Surface Methodology. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (4), 397-413.

Abstract

Introduction: Vinegar is an ancient fermented food consumed by human since Babylons period. It is a condiment that produced from various carbohydrate sources by alcoholic and subsequently acetic acid fermentation. Alcoholic fermentation is carried out by *Saccharomyces cerevisiae*, while the acetic acid fermentation is performed by acetic acid bacteria. Most of the acetic acid bacterial strains are classified in the *Acetobacter* genus and derived from vinegar factories that are able to oxidize ethanol to acetic acid and some strains over oxidize acetic acid into CO_2 and H_2O (over-oxidation). In acetic acid fermentation, important physical parameters that affect the growth of *A.aceti* are temperature, aeration and pH. Other most important factors for enhancing production efficiency of acetic acid are the nutrients of substrate for increases microbial activity. Considering the significant role of carbon sources and micronutrients in the fermentation culture to increase the production of acetic acid, in the present study, the effect of adding ammonium phosphate (0- 0.75 g), potassium sulfate (0- 0.75 g) and *Saccharomyces cerevisiae* (0- 1.5 g), were investigated to increase the production of acetic acid using *Acetobacter spp*.

Materials and methods: Yeast (*Saccharomyces cerevisae*) was obtained from the Iranian Research Organization for Science and Technology, Department of Biotechnology in Tehran, Iran with code number 5052. All chemicals were from Merck Co. Acetic acid production was performed by *Acetobacter* spp in a fermenter (Biostat B B.Brun) with a capacity of 10 L which contained 5000 ml of fermentation culture in 9.9 acidity. Mash with a capacity of 3000 ml containing 450 ml of vinegar with 9.9 acidity, 350 ml of ethanol 97%, 2.1 g of dextrose and the rest up to 3000 ml of water was produced and 300 ml of it was injected into the fermenter every 4 hours (in 10 steps). After complete injection, the fermentation operation continued for 9 hours. Agitation speed, aeration rate and temperature in the fermenter were 900 rpm, 50 L/min and 32°C, respectively. Determination of the best conditions for producing acetic acid was performed by Response Surface Methodology (RSM) in the form of central composite design. Independent variables were yeast concentration (0- 1.5 g), concentration of the ammonium phosphate (0- 0.75 g), and the potassium sulfate concentration (0- 0.75 g). RSM models were developed and optimization was done for the highest acidity, activity and oxidation value and the lowest residual alcohol content in the product. Optimal and control samples were examined in terms of qualitative characteristics such as acidity, activity, residual alcohol content, oxidation value, total

1. Former M.Sc. student, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Natural Resources, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
2. Associate professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Natural Resources, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
(*Corresponding Author Email: h.abbasi@khuisf.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.70315.1043

dissolved solids, reducing sugar, total phenol, ascorbic acid, sulfur dioxide and heavy metals. Comparison of the optimal and control samples was done in a completely randomized design using SAS ver: 9.1 software.

Results and discussion: The results showed that increasing the concentration of yeast and ammonium phosphate led to increase the initial and final acidity, activity and oxidation value and decrease the amount of residual alcohol. The effect of increasing potassium sulfate was negative and reduced the initial and final acidity, activity and oxidation value. However, interaction effects of potassium sulfate concentration with other variables at its intermediate levels on reducing the amount of residual alcohol in the product was positive. The optimal levels of the studied variables were determined as 1.5 g of *Saccharomyces cerevisiae*, 0.75 g of ammonium phosphate and 0.38 g of potassium sulfate. In control sample (without the independent variables), initial and final acidity, activity and oxidation index were lower and the residual alcohol content was higher than the standard level. Therefore, the optimal sample was compared with the control and using industrial activator (Astasome). The optimal sample in terms of initial and final acidity, activity, residual alcohol content and oxidation value had not a significant difference ($p > 0.05$) with the control sample (containing Astasome). Moreover, the optimal and control samples were not significantly difference in ascorbic acid and reducing sugar ($p > 0.05$), while the optimal sample in terms of total phenol content, sulfur dioxide and heavy metals like lead, zinc and copper was superior compared to the control sample ($p < 0.05$). Overall, the results of this study indicated the positive effect of yeast, ammonium phosphate, and the potassium sulfate at suitable concentration on qualitative characteristics of acetic acid.

The results revealed that using of appropriate amounts of *Saccharomyces cerevisiae*, ammonium phosphate and potassium sulfate in substrate as a source of micronutrients improve quality of acetic acid production by *Acetobacter spp*.

Keywords: Acetic acid, *Acetobacter*, *Saccharomyces cerevisiae*, Response surface methodology.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 397- 413

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۱۳-۳۹۷

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی تاثیر و بهینه‌یابی کمیت فسفات آمونیوم، سولفات پتاسیم و مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* در تولید اسید استیک در فرمانتور ناپیوسته با استفاده از روش سطح پاسخ

مرجان تیموری‌منش[1]- هاجر عباسی[2]*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۸
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۴/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۱۴

چکیده

تولید سرکه شامل دو مرحله تخمیر الکلی و اکسیداسیون استیکی می‌باشد. یکی از بارزترین عوامل مؤثر در افزایش راندمان تولید اسید استیک، مواد مغذی موجود در سوبسترا جهت فعالیت بیشتر میکروارگانیسم است. در این پژوهش اثر افزودن فسفات آمونیوم (۰/۷۵- صفر گرم)، سولفات پتاسیم (۰/۷۵- صفر گرم) و مخمر ساکارومایسز سرویزیه (۱/۵- صفر گرم) با هدف افزایش راندمان تولید اسید استیک توسط استوباکتر مورد بررسی قرار گرفت. تیمارها با استفاده از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی با چهار نقطه مرکزی ایجاد و پس از سپری شدن مراحل تولید، از نظر اسیدیته اولیه، اسیدیته نهایی، فعالیت، الکل باقی مانده و اندیس اکسیداسیون ارزیابی شدند. شرایط بهینه متغیرهای مستقل مشخص گردید و نتایج حاصل از ارزیابی ویژگی‌های کیفی محصول منتخب (مواد جامد نامحلول، قند احیاء، فنول کل، اسید آسکوربیک، دی‌اکسید گوگرد و فلزات سنگین) با نمونه شاهد مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که افزایش غلظت مخمر و فسفات آمونیوم باعث افزایش اسیدیته اولیه و نهایی، فعالیت و اندیس اکسیداسیون و کاهش میزان الکل باقی مانده در محصول می‌شود. اثر افزایش غلظت سولفات پتاسیم خصوصا در سطح بالای مورد بررسی بر اسیدیته اولیه و نهایی، فعالیت و اندیس اکسیداسیون کاهنده ارزیابی گردید. سطوح بهینه متغیرهای مورد بررسی شامل ۱/۵ گرم مخمر *ساکارومایسز سرویزیه*، ۰/۷۵ گرم فسفات آمونیوم و ۰/۳۸ گرم سولفات پتاسیم در نظر گرفته شد. نمونه بهینه تولیدی از نظر اسیدیته اولیه و نهایی، فعالیت، میزان الکل باقی مانده و اندیس اکسیداسیون تفاوت معنی‌داری (p>۰/۰۵) با نمونه دارای فعال‌کننده صنعتی (آستازوم) نشان نداد. در حالیکه این نمونه دارای محتوی فنول کل بیشتر (۶/۵ mg/L) و میزان دی‌اکسید گوگرد (۶/۲۵ mg/kg)، سرب (۰/۰۰۷۵ mg/kg)، روی (۰/۴۵ mg/kg) و مس (۰/۲۲۵ mg/kg) کمتری نسبت به نمونه شاهد بود (p<۰/۰۵).

واژه‌های کلیدی: اسید استیک، استوباکتر، *ساکارومایسز سرویزیه*، روش سطح پاسخ.

مقدمه

کلمه سرکه برگرفته از واژه فرانسوی "Vinaigre" به معنی شراب ترش است. این محصول به روش‌های مختلف و با استفاده از مواد اولیه گوناکون قابل تولید است. براساس تعریف استاندارد ایران، سرکه فرآورده‌ای است که از تخمیر الکلی ملاس و سپس تخمیر استیکی الکل رقیق شده حاصل می‌گردد و بایستی دارای حداقل ۵٪ اسید استیک باشد (Sharifi et al., 2015). تولید سرکه شامل دو مرحله اساسی تخمیر الکلی و اکسیداسیون استیکی می‌باشد. عوامل مؤثر در مرحله تخمیر الکلی که کنترل آنها از اهمیت زیادی برخوردار است شامل نوع مخمر، غلظت قند، مواد مغذی، pH، غلظت اکسیژن محلول و درجه حرارت می‌باشد. از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار در مرحله اکسیداسیون استیکی نیز می‌توان به نوع میکروارگانیسم، غلظت الکل، غلظت اکسیژن محلول و درجه حرارت اشاره نمود (Robert, 2006). سرکه اثرات مفیدی از جمله اثرات ضددیابتی، تحریک اشتها، خواص آنتی‌اکسیدانی، بهبود خستگی، تنظیم فشار خون و کاهش چربی و کلسترول خون با مهار اکسیداسیون لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین (LDL) برای مصرف‌کنندگان به دنبال دارد (Sharifi et al., 2015). علاوه بر مصرف مستقیم سرکه، این محصول در فرآوری محصولات غذایی مختلف به‌عنوان نگهدارنده و طعم‌دهنده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Budak et al., 2014). اسید استیک یکی از ساده‌ترین اسیدهای آلی است که دارای بوی تیز و مزه ترش است و به‌عنوان یکی از مواد حد واسط مهم در

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.
۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.
* - نویسنده مسئول: Email: h.abbasi@khuisf.ac.ir
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.70315.1043

بسیاری از صنایع شناخته می‌شود. اسید استیک از روش‌های مختلف شیمیایی و تخمیر میکروبی توسط باکتری‌های تولیدکننده اسید استیک تولید می‌شود. تاکنون باکتری‌های تولیدکننده اسید استیک از مناطق مختلف جهان جدا شده و مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. سویه های بومی هر منطقه ممکن است دارای ویژگی‌های خاص خود باشند. از این‌رو پیشرفت فرایندهای تولید اسید استیک می‌تواند با مطالعه دقیق‌تر سویه‌های بومی، شرایط جغرافیایی و آب و هوایی مختلف همراه شود. در سال‌های اخیر، طبقه‌بندی باکتری‌های اسید استیک گسترش یافته و این میکروارگانیسمها به ۱۵ جنس تقسیم شده‌اند.

در فرایندهای زیستی، تأمین مواد (منبع کربن و نیتروژن، مخمر، ریز مغذی‌ها) بخش عمده‌ای از هزینه‌های اولیه و اصلی را به‌خود اختصاص می‌دهند. تاکنون انواع کربوهیدارت‌ها و منابع نیتروژنی از جمله گلوکز، سوکروز، مالتوز، مانیتول، ملاس، ذرت، کاه و لاکتوز آب پنیر برای تولید اسیدهای مختلف از جمله اسید استیک، اسید سیتریک، پروپیونیک اسید و اسید لاکتیک به‌کار رفته‌اند (Sharifi et al., 2015). از مشخصه‌های بارز مخمرها و باکتری‌های مورد استفاده برای تولید اسیدهای مختلف، می‌توان به توانایی آنها در تخمیر سریع و کامل مواد خام و ارزان، نیاز به حداقل مواد نیتروژنی و بازدهی بالا برای تولید محصول اشاره کرد. مطالعات پیشین نشان داده است که عوامل متعددی نظیر نوع و غلظت منبع کربن، نوع و مقدار مخمر و استفاده از عناصر معدنی و ریز مغذی‌ها تأثیر زیادی در افزایش سرعت فرایند تخمیر و بازده تولید اسیدهای مختلف دارند (Ding & Tan, 2006). با توجه به گستردگی مصرف اسید استیک در صنایع مختلف و با هدف افزایش میزان تولید این اسید، تاکنون تحقیقات متعددی در خصوص نقش ریزمغذی‌ها و عوامل مختلف مؤثر در تخمیر اسید استیک بر تولید این محصول صورت گرفته است. Aguilar Uscanga و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که منابع کربن نقش قابل توجهی در بازده تولید اسید استیک دارند. این محققان از گلوکز، ملاس نیشکر، نیشکر تصفیه شده، آناناس و آب نیشکر و چغندرقند به عنوان منبع کربن استفاده کردند و به این نتیجه دست یافتند که بیشترین غلظت اسید استیک تولیدی، بازده تولید اسید استیک و همچنین راندمان تولید اتانول که به‌ترتیب برابر با ۰/۲۴ g/g، ۱۴/۵ g/L و ۰/۱۴ g/L/h هستند، زمانی به‌دست می‌آید که از ملاس نیشکر حاوی ۶۰ گرم بر لیتر سوکروز به عنوان منبع انرژی استفاده شده باشد (Aguilar Uscanga et al., 2006). Awad و همکاران (۲۰۱۲) نیز با بهینه‌سازی فرایند تولید اسید استیک توسط *استوباکتر استی* گزارش نمودند که بالاترین میزان تولید اسید استیک (۵۳ g/L)، در حضور ۱۰۰ g/L گلوکز، ۵ g/L پپتون، ۱۲ g/L مخمر و ۱۴۴ ساعت تخمیر حاصل می‌آید (Awad et al., 2012). در تحقیق دیگری محققان به بررسی اثر محرک‌های رشد و ریزمغذی‌ها بر تولید اسید استیک پرداختند. نتایج آنها نشان داد که در ۵٪ غلظت اتانول، ۰/۵٪ دی پتاسیم فسفات و ۰/۲۵٪ آمونیوم سولفات بیشترین میزان اسید استیک تولید می‌شود (Joshi et al., 2016). Rosada (۲۰۱۸)، با مطالعه اثر غلظت قند اولیه (صفر، ۱۰، ۲۰٪ وزنی/ حجمی)، نسبت *ساکارومایسز سرویزیه* به استوباکتر (۳:۷، ۱:۱، ۷:۳) و سرعت اختلاط (۸۰، ۱۶۰ دور بر دقیقه) بر تولید اسید استیک، شرایط بهینه جهت دستیابی به حداکثر مقدار اسید استیک را غلظت صفر درصد گلوکز، نسبت ۳:۷ *ساکارومایسز سرویزیه* به استوباکتر، سرعت اختلاط ۱۶۰ دور بر دقیقه طی مدت ۱۰ روز تخمیر توصیه کردند (Rosada et al., 2018). Abdolalizadeh و همکاران (۲۰۱۰)، با بررسی اثر ۴ غلظت مختلف منبع ازت شامل عصاره مخمر (صفر، ۲، ۵، ۸ گرم بر لیتر)، پپتون (صفر، ۲، ۵، ۸ گرم بر لیتر) و سولفات آمونیوم (۵، ۸، ۱۲، ۱۵ گرم بر لیتر) بر راندمان تولید اسید لاکتیک توسط *لاکتوباسیلوس کازئی* به این نتیجه دست یافتند که با افزودن پپتون به محیط کشت، تولید اسید لاکتیک افزایش قابل توجهی می‌یابد (Abdolalizadeh et al., 2010). همچنین با افزایش غلظت عصاره مخمر و سولفات آمونیوم در محیط کشت، راندمان تولید اسید لاکتیک افزایش چشمگیری نشان داد. علاوه بر اهمیت غلظت اکسیژن محلول و منابع کربن مورد استفاده در محیط کشت تخمیر، محیط کشت باید با عناصر کم مقدار دیگری که جهت رشد و تخمیر مخمر ضروری هستند، غنی‌سازی شود که از مهم‌ترین آنها می‌توان به عناصر معدنی نظیر نیتروژن، فسفر، گوگرد و روی اشاره کرد. لذا، در پژوهش حاضر تأثیر عصاره مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* به‌عنوان محرک رشد فعالیت باکتری *استوباکتر استی* و غلظت‌های مختلف فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم به‌عنوان ریز مغذی و عناصر ریز مقدار جهت افزایش راندمان تخمیر و بازدهی تولید اسید استیک، و همچنین بهینه‌یابی متغیرهای مورد بررسی (غلظت فسفات آمونیوم، سولفات پتاسیم و عصاره مخمر) در فرمانتور ناپیوسته برای دستیابی به تولید حداکثر غلظت اسید استیک با ویژگی‌های کیفی مناسب مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سویه *ساکارومایسز سرویزیه* (PTCC 5052) از بخش بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه، و در کلیه مراحل این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. کلیه مواد آزمایشگاهی مورد استفاده در این پژوهش، با خلوص بالا از شرکت مرک (آلمان)، خریداری شدند.

آماده‌سازی نمونه‌ها

تولید اسید استیک توسط سویه مورد نظر در فرمانتور (Biostat B B.Brun) با گنجایش ۱۰ لیتر که حاوی ۵۰۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت اولیه با اسیدیته ۹/۹ بود، انجام گرفت. مش با ظرفیت ۳۰۰۰ میلی‌لیتر حاوی ۴۵۰ میلی‌لیتر سرکه با اسیدیته ۹/۹، ۳۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۷٪، ۲/۱ گرم دکستروز، مخمر *ساکارومایسز سرویزیه*، فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم مطابق مقادیر ارائه شده برای تیمارهای مختلف (جدول ۱) و مابقی تا حجم ۳۰۰۰ میلی‌لیتر آب آماده شد و در فواصل زمانی ۴ ساعت یک بار ۳۰۰ میلی‌لیتر به فرمانتور تزریق شد. پس از تزریق کامل آن، عملیات تخمیر به مدت ۱۲ ساعت ادامه یافت. سرعت اختلاط، میزان هوادهی و دمای فرمانتور به‌ترتیب، ۹۰۰ دور در دقیقه، ۵۰ لیتر در دقیقه و ۳۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. متغیرهای مستقل شامل درصد مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* (۱/۵- صفر درصد)، درصد فسفات آمونیوم (۰/۷۵- صفر درصد) و درصد سولفات پتاسیم (۰/۷۵- صفر درصد) درنظر گرفته شدند. برای ارزیابی تاثیر متغیرها و به‌دست آوردن نقطه بهینه، ۲۰ ترکیب مختلف از متغیرها آزمایش توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت (Design Expert) پیشنهاد گردید که سطوح متغیرهای مستقل و مقادیر متغیرهای وابسته اندازه‌گیری شده آنها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- سطوح متغیرهای مستقل در تیمارهای مختلف سطح پاسخ و مقادیر متغیرهای وابسته آنها

Table 1- Levels of independent variables in different treatments and the values of their dependent variables

Potassium sulfate (g) سولفات پتاسیم (گرم)	Ammonium phosphate (g) فسفات آمونیوم (گرم)	*Saccharomyces cerevisiae* (g) مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* (گرم)	Treatments تیمار
0.13	0.13	0.25	**1**
0.38	0.38	0.75	**2**
0.38	0.38	0.75	**3**
0.38	0.38	0.75	**4**
0.00	0.38	0.75	**5**
0.38	0.38	1.5	**6**
0.13	0.63	0.25	**7**
0.38	0.75	0.75	**8**
0.38	0.38	0.75	**9**
0.63	0.13	1.25	**10**
0.13	0.63	1.25	**11**
0.63	0.63	0.25	**12**
0.13	0.13	1.25	**13**
0.38	0.38	0.75	**14**
0.38	0.00	0.75	**15**
0.38	0.38	0.00	**16**
0.63	0.13	0.25	**17**
0.63	0.63	1.25	**18**
0.75	0.38	0.75	**19**
0.38	0.38	0.75	**20**

ارزیابی ویژگی‌های شیمیایی

اندازه‌گیری اسیدیته

اندازه‌گیری اسیدیته نمونه‌ها در دو مرحله اسیدیته اولیه (بعد از ۹ ساعت تخمیر) و اسیدیته نهایی (بعد از ۱۲ ساعت تخمیر)، مطابق با روش استاندارد AACC – 02-31.01، و بر اساس تیتراسیون با سود نیم نرمال در مجاورت معرف فنل فتالئین انجام گرفت.

ارزیابی فعالیت

پارامتر فعالیت بیانگر افزایش اسیدیته در واحد زمان است، و از تفاوت اسیدیته اولیه و اسیدیته نهایی در یک محدوده زمان ۳ ساعت محاسبه می‌گردد (رابطه ۱). در این پژوهش میزان فعالیت برای تمامی تیمارها در واحد زمان ثابت (۳ ساعت) اندازه‌گیری گردید. از آنجایی که بین محدوده زمانی ۹ تا ۱۲ ساعت در فرایند تولید، شدت این تغییر چشمگیرتر است، ارزیابی این پارامتر در این بازه زمانی انجام گرفت.

(۱) زمان/ (اسیدیته اولیه- اسیدیته نهایی)= فعالیت

اندازه‌گیری الکل باقی‌مانده

میزان الکل باقی مانده مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۱۳۹۴ و طی دو مرحله تقطیر سرکه و سپس اکسید کردن آن و در نهایت اندازه‌گیری بی‌کرومات پتاسیم باقی‌مانده تعیین گردید. بدین منظور، ۱۰ میلی‌لیتر سرکه و ۶۰ میلی‌لیتر آب درون یک بالن تقطیر ۲۵۰ میلی‌لیتری مخلوط گردید. در حضور معرف فنل فتالئین، سدیم هیدروکسید ۰/۱ نرمال قطره قطره به محلول اضافه گردید تا به رنگ ثابت (قرمز ارغوانی) برسد. فرایند تقطیر تا دستیابی به ۵۰ میلی‌لیتر محلول تقطیر شده انجام گرفت و با آب مقطر به حجم رسانده شد. در مرحله اکسید کردن، ۲۰ میلی‌لیتر سرکه تقطیر شده به درون یک ارلن مایر انتقال داده شد و ۱۰ میلی‌لیتر محلول نیتروکرومیک به آن اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و حدود ۱ گرم یدور پتاسیم به محلول اضافه گردید و ید آزاد شده با تیوسولفات ۰/۱ نرمال تیتر شد. مقدار الکل باقی مانده (حجمی/ حجمی) مطابق رابطه ۲ به‌دست آمد.

(۲) الکل باقی‌مانده = ۰/۱۱۴ × (B −A)

در رابطه فوق، A: حجم تیوسولفات مصرفی برای نمونه و B: حجم تیوسولفات مصرفی برای شاهد می‌باشد.

تعیین اندیس اکسیداسیون

ارزش اکسیداسیون بیانگر سانتی‌متر مکعب پرمنگنات پتاسیم ۱/۱۰۰ نرمالی است که ۱۰۰ گرم از نمونه تحت شرایط استاندارد در مدت ۳۰ دقیقه مصرف می‌کند. برای اندازه‌گیری اندیس اکسیداسیون، ۵ میلی‌لیتر از نمونه به بالن انتقال داده شد و ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک رقیق شده و ۱۵ میلی‌لیتر محلول پتاسیم پرمنگنات ۰/۰۰۲ مولار به آن اضافه گردید. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن ۵ میلی‌لیتر محلول یدور پتاسیم ۱۰٪ افزوده شد و یدور آزاد شده با تیوسولفات ۰/۰۲ مولار و با استفاده از محلول نشاسته ۱٪ تیتر گردید. ارزش اکسیداسیون با استفاده از رابطه ۳ محاسبه شد (Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 2003).

(۳) اندیس اکسیداسیون =۴۰× (B −A)

در رابطه فوق، A: حجم تیوسولفات مصرفی برای نمونه و B: حجم تیوسولفات مصرفی برای شاهد می‌باشد.

بررسی و مقایسه پارامترهای کیفی نمونه بهینه و شاهد

پس از مدل‌سازی و بررسی تاثیر متغیرهای مستقل بر تغییرات متغیرهای وابسته، سطوح مناسب متغیرهای مستقل تعیین و نمونه بهینه با استفاده از سطوح مناسب متغیرها تهیه گردید. نمونه‌های بهینه و شاهد از نظر ویژگی‌های کیفی از جمله میزان مواد جامد نامحلول، فلزات سنگین، اسید آسکوربیک، محتوی فنول کل، میزان قند احیاء و دی اکسید گوگرد مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند.

اندازه‌گیری مواد جامد نامحلول

میزان مواد جامد نامحلول مطابق با روش Dahdouh و همکاران (۲۰۱۶)، و بر اساس خشک کردن در آون تعیین شد (Dahdouh et al., 2016).

اندازه‌گیری فلزات سنگین

به‌منظور تعیین میزان فلزات سنگین، ابتدا ۵ میلی‌لیتر از نمونه‌ها با ۳ میلی‌لیتر مخلوط اسید کلریدریک ۶ نرمال و اسید نیتریک ۰/۱ نرمال (نسبت ۱:۳) هضم اسیدی شدند. محلول شفاف به‌دست آمده با استفاده از آب دیونیزه به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و محلول‌ها جهت اندازه‌گیری غلظت عناصر سنگین آماده شدند. غلظت فلزات سنگین سرب، آرسنیک، آهن، روی و مس، با استفاده از دستگاه جذب اتمی (Avanta، شرکت GBC، ایتالیا) به‌ترتیب در طول موج‌های ۲۸۳/۳، ۱۹۳/۷، ۲۴۸/۳، ۲۱۳/۹ و ۳۲۴/۸ نانومتر تعیین شد (Balali-Mood et al., 2018).

اندازه‌گیری دی‌اکسید گوگرد

میزان دی‌اکسید گوگرد با روش یدومتری مستقیم فرآورده مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۴۳۰۸ اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری اسید آسکوربیک

میزان ویتامین C مطابق با روش مصوب استاندارد AOAC-967/21 و بر اساس استخراج اسید آسکوربیک نمونه، با استفاده از محلول اسید اگزالیک ۲٪، و عیارسنجی با معرف ۲و ۶- دی کلروفنل ایندوفنل تا ظهور رنگ صورتی روشن تعیین شد. مقدار اسید آسکوربیک بر حسب میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک بیان گردید.

اندازه‌گیری فنول کل

محتوی فنولیک کل بر اساس روش رنگ‌سنجی و با استفاده از معرف فولین سیوکالتو مطابق با روش ارائه شده توسط Hafzan و همکاران (۲۰۱۷) تعیین گردید. بدین منظور، ۳/۹ میلی‌لیتر آب مقطر،

۰/۱ میلی‌لیتر نمونه با ۰/۵ میلی لیتر از معرف فولین سیوکالتو (۱۰ برابر رقیق شده با آب) مخلوط شد. پس از ۶-۳ دقیقه، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۲۰ درصد به محلول اضافه و مخلوط گردید. جذب نوری محلول‌ها پس از گذشت ۳۰ دقیقه در تاریکی در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت گردید. مقدار فنول کل موجود در نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید بر حسب اکی‌والان گالیک اسید در لیتر (mg/L) محاسبه شد (Hafzan et al., 2017).

اندازه‌گیری قند احیاء

اندازه‌گیری میزان قند احیاء مطابق با روش مصوب استاندارد AOAC 920.51، و بر اساس روش لین- آنیون و با استفاده از محلول‌های فهلینگ A و B انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این تحقیق، به‌منظور بررسی تأثیر متغیرهای مستقل شامل درصد مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* (A)، درصد فسفات آمونیوم (B) و درصد سولفات پتاسیم (C) بر پاسخ‌ها (اسیدیته اولیه، اسیدیته نهایی، فعالیت، الکل باقی مانده، اندیس اکسیداسیون) از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت ورژن ۹ و روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی با ۵ نقطه مرکزی استفاده شد. کلیه بررسی‌های آماری و معنی‌داری و یا غیرمعنی‌داری داده‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام گردید. جست وجوی شرایط عملیاتی بهینه جهت دستیابی به پاسخ‌های مطلوب مورد نظر با استفاده از تکنیک بهینه‌سازی عددی انجام گرفت. در روش RSM پس از تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار، برای هر متغیر وابسته مدلی با انحراف استاندارد (SD) و مجموع مربعات باقی مانده برآورد شده (PRESS) اندک و ضریب همبستگی (R^2) بالا تعریف می‌گردد و آثار اصلی و متقابل متغیرها بر فاکتور مربوطه را بیان می‌کند. همانطور که در معادله ۱ مشاهده می‌شود، برای پاسخ پیش‌بینی شده Y، ضریب ثابت β_0، اثرات خطی β_a، β_b، β_c، اثرات مجذور β_{aa}، β_{bb}، β_{cc} و اثرات متقابل β_{ab}، β_{ac}، β_{bc} تعریف می‌شوند.

$$Y=\beta_0+\beta_aA+\beta_bB+\beta_cC+\beta_{aa}A^2+\beta_{bb}B^2+\beta_{cc}C^2+\beta_{ab}AB+\beta_{ac}AC+\beta_{bc}BC \quad (۴)$$

آنالیز نتایج به‌دست آمده از مقایسه نمونه‌های بهینه و شاهد در قالب طرح کاملا تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار SAS ver: 9.0 صورت گرفت. به‌منظور مقایسه میانگین‌ها و بررسی معنی‌دار بودن اختلاف بین داده‌ها، حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) میان آنها، در سطح اطمینان ۹۵ درصد تعیین گردید.

نتایج و بحث

برای به‌دست آوردن مدل تجربی برای پیش‌بینی متغیرهای پاسخ (اسیدیته اولیه، اسیدیته نهایی، فعالیت، الکل باقی‌مانده، اندیس اکسیداسیون) ابتدا رابطه‌های چند جمله‌ای خطی، دو فاکتوریلی (تعاملی)، درجه دو و درجه سه بر داده‌های به‌دست آمده از این پاسخ برازش داده شدند و سپس این مدل‌ها مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. از نظر آماری مدلی مناسب است که آزمون عدم برازش آن معنی‌دار نبوده و دارای بالاترین ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده باشد. نتایج نشان داد مدل مناسب برای پیشگویی تغییرات اسیدیته اولیه (پس از گذشت ۹ ساعت تخمیر)، اسیدیته نهایی (بعد از ۱۲ ساعت تخمیر)، فعالیت و الکل باقی مانده در محصول در اثر تغیر کمیت متغیرهای مورد بررسی (غلظت مخمر، غلظت فسفات آمونیوم، غلظت سولفات پتاسیم)، مدلی درجه دو و برای تغییرات اندیس اکسیداسیون مدل خطی درجه اول با ضریب تبیین حدود ۰/۹۰ می باشد. نتایج تجزیه واریانس متغیرهای پاسخ در جدول ۲ آورده شده است.

تغییرات اسیدیته اولیه و نهایی

اسیدیته و pH معیارهای مناسبی جهت ارزیابی سرعت تخمیر استیکی محسوب می‌شوند. افزایش اسیدیته نشان‌دهنده تولید اسید استیک و تبدیل الکل به اسید می‌باشد (Ozturk et al., 2015). نتایج حاصل از جدول ۳ نشان می‌دهد که افزایش غلظت مخمر و غلظت فسفات آمونیوم اثر مثبت و معنی‌دار بر میزان اسیدیته اولیه و نهایی داشت، به‌طوریکه افزایش غلظت مخمر و غلظت فسفات آمونیوم سبب افزایش اسیدیته گردید. اثر متقابل غلظت مخمر و فسفات آمونیوم در مقادیر بالا نیز باعث افزایش اسیدیته اولیه و نهایی محصول گردید (شکل ۱- الف و ج). بر اساس ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره مخمر، مخمر نه تنها یک منبع نیتروژن آلی بلکه منبع عالی از بسیاری از ریز مغذی‌ها از جمله اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و فاکتورهای رشد با وزن مولکولی کم است. به همین علت افزایش تولید اسید استیک تابعی از غلظت مخمر به‌کار رفته در محیط کشت می‌باشد (Awad et al., 2012). از طرف دیگر، یکی از عوامل مهم و کلیدی در افزایش راندمان تولید اسید استیک، ترکیب مواد مغذی محیط تخمیر برای رشد و سوخت و ساز مخمر است که به شدت بر کیفیت محصول نهایی تأثیر می‌گذارد. لذا، افزایش اسیدیته و یا به عبارتی تولید بیشتر اسید استیک با افزایش غلظت فسفات آمونیوم را می‌توان اینگونه توضیح داد که افزایش نیتروژن معدنی (نمک آمونیوم) در محیط باعث می‌گردد که رشد مخمر سریع‌تر صورت گیرد و قند بیشتری از سوبسترا را برای تکثیر مصرف کند و درنهایت باعث افزایش سرعت تخمیر شود. اگرچه به‌نظر می‌رسد

مقادیر بالاتر فسفات آمونیوم عامل محدودکننده رشد باکتری استوباکتر بوده و سبب کاهش اسیدیته اولیه و نهایی شده است (Pooja & Soumitra, 2013).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثرات سطح مخمر، غلظت فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم بر ویژگی‌های کیفی (اسیدیته اولیه، اسیدیته نهایی، فعالیت، الکل باقی مانده، اندیس اکسیداسیون) اسید استیک

Table 2- Variance analysis of the effects of yeast level, ammonium phosphate and potassium sulfate concentration on the qualitative characteristics (initial acidity, final acidity, activity, residual alcohol, oxidation index) of acetic acid

Response پاسخ										
Oxidation index اندیس اکسیداسیون		Residual alcohol الکل باقی مانده		Activity فعالیت		Final acidity اسیدیته نهایی		Initial acidity اسیدیته اولیه		
Total Squares مجموع مربعات	Degree of Freedom درجه آزادی	Total Squares مجموع مربعات	Degree of Freedom درجه آزادی	Total Squares مجموع مربعات	Degree of Freedom درجه آزادی	Total Squares مجموع مربعات	Degree of Freedom درجه آزادی	Total Squares مجموع مربعات	Degree of Freedom درجه آزادی	Source of changes منبع تغییرات
4435391***	6	16.26***	6	0.01***	8	21.88***	6	19.07***	6	**Model مدل**
1657315***	1	2.40***	1	0.005***	1	2.27***	1	1.66***	1	**A**
1161027***	1	8.46***	1	0.002***	1	10.92***	1	9.63***	1	**B**
675072.4***	1	1.13**	1	0.004***	1	2.01***	1	1.59***	1	**C**
714012.5***	1	0.69**	1	0.001***	1	0.95***	1	0.85***	1	**AB**
46512.5ns	1	–	–	8.19*10-5*	1	–	–	–	–	**AC**
132612.5*	1	1.32**	1	0.0003***	1	1.86***	1	1.81***	1	**BC**
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	**A^2**
–	–	2.27***	1	5.41*10-5ns	1	3.93***	1	3.58***	1	**B^2**
–	–	–	–	6.8*10-5*	1	–	–	–	–	**C^2**
304829.5	13	0.97	13	0.0001	11	1.18	13	1.09	13	**Residual باقی مانده**
268946.1ns	8	0.62ns	1	0.0001ns	6	0.83 ns	8	0.74ns	1	**Lack of fit عدم برازش**
35883.33	5	0.35	5	3.68*10-5	5	0.35	5	0.35	5	**Total error خطای کل**
4740220	19	17.23	19	0.01	19	23.06	19	20.16	19	**Total کل**

خطوط تیره در جدول نشان دهنده بی‌تأثیر بودن متغیر مربوطه در پاسخ‌های اندازه‌گیری شده است.

***: اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱ درصد، **: اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد، *: اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد.

ns: عدم وجود اختلاف معنی‌دار

The dark lines in the table indicate that the relevant variable has no effect on the measured responses.

***: significant difference at the 0.001%, **: significant difference at the 1% level, *: Significant difference at the 5%.

ns: no significant difference

جدول ۳- ضرایب مدل‌های برازش یافته بر صفات مورد مطالعه

Table 3- Coefficients of developed models on the studied parameters

Oxidation index اندیس اکسیداسیون	Residual alcohol الکل باقی مانده (٪)	Activity فعالیت	Final acidity اسیدیته نهایی (٪)	Initial acidity اسیدیته اولیه (٪)	Coefficient ضریب
		Response پاسخ			
1025.66***	1.55***	0.05***	9.78***	9.63***	β_0
324.97***	-0.39***	0.02***	0.38***	0.32***	β_1
271.90***	-0.73***	0.01***	0.83***	0.78***	β_2
-207.33**	0.27**	-0.02***	-0.36***	-0.23***	β_3
237.65***	-0.23**	0.01***	0.27***	0.26***	β_{12}
-60.66^{ns}	–	-0.003*	–	–	β_{13}
102.42*	-0.32***	0.005***	0.38***	0.38***	β_{23}
–	–	–	–	–	β_{11}
–	0.37***	-0.002 ^{ns}	-0.49***	-0.47***	β_{22}
–	–	*-0.002	–	–	β_{33}
0.93	0.94	0.98	0.94	0.94	R^2
268946.10	0.62	0.0001	0.83	0.74	Lack of Fit

صفر: عرض از مبدا، ۱: غلظت مخمر، ۲: غلظت فسفات آمونیوم، ۳: غلظت سولفات پتاسیم.

*، **، *** به‌ترتیب، نشان دهنده معنی‌داری در سطح احتمال ۹۵٪، ۹۹٪ و ۹۹/۹٪ و ns عدم معنی‌دار بودن را نشان می‌دهد.

0: intercept 1: yeast concentration, 2: ammonium phosphate concentration, 3: potassium sulfate concentration

*, **, *** indicate significance at the probability level of 95%, 99% and 99.9% respectively and ns indicates non-significance.

بر طبق نتایج، اثر مستقل افزایش غلظت سولفات پتاسیم بر اسیدیته اولیه و نهایی محصول منفی و کاهنده ارزیابی شد (P<0.001). علت این امر می‌تواند به بازدارندگی یون پتاسیم و یا سولفور بر رشد و تخمیر *ساکارومایس سرویزیه* و همچنین برهم-کنش‌های میان یون‌های فلزی موجود در محیط و اثر محدودکنندگی آنها در انجام واکنش نسبت داده شود (Gorji et al., 2007). البته همانطور که در شکل (۱- ب و د) مشاهده می‌شود، افزودن همزمان فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم، تاثیر مثبت بر تغییرات اسیدیته اولیه و نهایی محصول دارد. بررسی منابع در خصوص تاثیر سوبسترا بر فعالیت باکتری‌های تولیدکننده اسید، نشان از تاثیر متفاوت عناصر مختلف بر کمیت و کیفیت محصول دارد. در این راستا Haq و همکاران (۲۰۰۲)، نشان دادند که افزودن یون مس تأثیر مستقیمی در تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر* دارد (Haq et al., 2002). در تحقیقی که توسط مظاهری اسدی و نیکخواه ممان (۲۰۰۳) در رابطه با تولید اسید سیتریک از تفاله خرما انجام گرفت، از فروسیانید پتاسیم جهت غنی‌سازی محیط تخمیر استفاده شد (Mazaheri Asadi, and Nikkhah Maman, 2003). نتایج نشان داد که استفاده از فروسیانید پتاسیم اثر محسوسی در افزایش راندمان تولید اسید سیتریک نداشت و اضافه کردن فروسیانید پتاسیم تا غلظت ۰/۷۵ گرم در هر کیلوگرم تفاله خرما فقط تا حد کمی آهنگ تولید اسید سیتریک را افزایش داده است. Nadeem و همکاران (۲۰۱۷)، گزارش نمودند که با افزایش غلظت سوبسترا از ۱۰٪ تا ۱۵٪ بازده تولید سیتریک اسید توسط *آسپرژیلوس نیجر* افزایش در غلظت‌های بالاتر از ۱۵٪ کاهش می‌یابد. در مطالعه‌ای دیگر نتایج بیانگر آن بود که با افزایش غلظت سوبسترا (ذرت، سیب زمینی، سویا، بادام زمینی)، از ۲ به ۱۰ گرم میزان تولید اسید استیک و اسید بوتریک و همچنین غلظت قندهای احیاءکننده به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است (Nadeem et al., 2017). در میان غلظت‌های مورد بررسی، غلظت ۸ گرم به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر به عنوان شرایط بهینه جهت افزایش بازده تخمیر معرفی شد (Zhang et al., 2020).

تغییرات فعالیت

تغییرات فعالیت میزان افزایش اسیدیته در واحد زمان را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از جدول ۲ نشان می‌دهد که مدل درجه دوم به دست آمده از تغییرات فعالیت در تیمارهای مختلف معنی‌دار ارزیابی شد (P<0.001). اثرات متقابل متغیرهای مورد بررسی در سطح اطمینان ۹۹/۹ درصد معنی‌دار بود که نشان‌دهنده تأثیر توأم متغیرهای مستقل بر تغییرات فعالیت می‌باشد. بر اساس نتایج به‌دست آمده از جدول ۳، مثبت بودن ضریب رگرسیون خطی غلظت مخمر و فسفات آمونیوم مؤید این مطلب است که با افزایش غلظت مخمر و فسفات

آمونیوم مصرفی، میزان فعالیت افزایش می‌یابد. درحالیکه، روند تغییرات میزان فعالیت با افزایش غلظت سولفات پتاسیم کاهشی بود (P<0.001). اثر متقابل غلظت مخمر و فسفات آمونیوم در محدوده نسبتا وسیعی از تغییرات هر دو متغیر به ویژه مقادیر بالاتر آنها موجب افزایش میزان فعالیت نمونه‌ها شده است (شکل ۱- ه) در حالیکه، اثر متقابل غلظت مخمر و سولفات پتاسیم در سطوح مختلف متفاوت بود. به‌نحوی که تا سطوح متوسط متغیرها، افزایش و پس از آن کاهش چشمگیر فعالیت مشاهده گردید (شکل ۱- و). اثر متقابل غلظت فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم در مقادیر بالا نیز در افزایش میزان فعالیت تیمارها مثبت و معنی‌دار ارزیابی شد (شکل ۱- ز). به‌طور کلی باید اشاره داشت که اثر متقابل سولفات پتاسیم با سایر متغیرها و همچنین مقادیر متوسط آن بر تغییرات فعالیت مثبت بود. نتایج مطالعات متعدد حاکی از آن است که نوع و غلظت سوبسترا تأثیر به سزایی بر سرعت فرایند تخمیر و افزایش بازده تولید اسیدهای مختلف دارد. Cevrimli و همکاران (۲۰۰۹) گزارش نمودند که با افزایش غلظت قند از ۵۰ تا ۱۴۰ گرم بر لیتر تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نیجر* افزایش و در غلظت‌های بالاتر از ۱۴۰ گرم بر لیتر بازده تولید اسید سیتریک کاهش می‌یابد (Cevrimli et al., 2009). نتایج تحقیقی دیگر نیز نشان داد که افزودن فروکتوز در محیط کشت حاوی سبوس جو و همچنین افزایش غلظت آن از ۵٪ تا ۲۰٪ موجب افزایش تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نیجر* شده است. درحالیکه با افزایش غلظت آمونیوم نیترات از ۰/۲۵٪ تا ۱٪ وزنی/حجمی روند کاهشی در تولید اسید سیتریک به‌دست آمده است (Rao & Reddy, 2013).

محتوی الکل باقی‌مانده

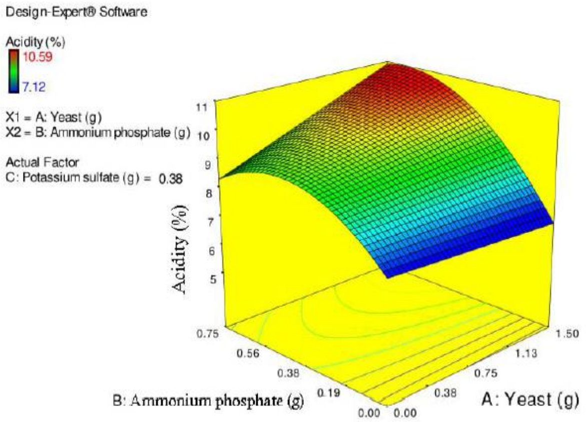
فرایند تولید سرکه شامل دو نوع فرایند تخمیری الکلی و استیکی می‌باشد. در مرحله تخمیر الکلی، کربوهیدرات‌های موجود در سوبسترا توسط مخمرها به الکل اتیلیک تبدیل می‌شود. در مرحله استیکی، الکل حاصل از مرحله قبل به‌عنوان سوبسترا توسط استوباکترها، طی فرایند اکسیداسیون به اسید استیک تبدیل می‌شود. ابتدا اتانول در حضور اکسیژن هوا به استالدئید تبدیل و سپس توسط آنزیم آلدئید دهیدروژناز باکتری به اسید استیک دهیدروژنه می‌گردد. بنابراین در فرایند تولید سرکه، الکل یک محصول حد واسط است که میزان تولید و مصرفش در زمان‌های مختلف تخمیر الکلی و استیکی متفاوت است، از این‌رو وجود الکل در مرحله پایانی فرایند تولید سرکه دور از انتظار نخواهد بود. میزان مجاز و حد قابل قبول الکل در سرکه مطابق با استاندارد ملی ۰/۵ درصد تعریف شده است (Nascimento et al., 2005). نتایج حاصل از جدول ۲ نشان می‌دهد که مدل درجه دوم به دست آمده از تغییرات محتوی الکل باقی مانده در محصول معنی‌دار ارزیابی گردید (P<0.001). معنی‌دار بودن اثرات متقابل برخی از متغیرهای مورد بررسی در سطح احتمال ۹۵ و ۹۹ درصد نشان‌دهنده تأثیر توأم متغیرها بر میزان الکل باقی مانده می‌باشد. منابع تغییرات مدل نشان می‌دهد، با افزایش غلظت مخمر و فسفات آمونیوم میزان الکل باقی مانده کاهش یافت (جدول ۳). این مشاهده به افزایش سرعت تخمیر الکلی و اکسیداسیون استیکی در حضور ریز مغذی‌های موجود در محیط مرتبط است (Maris et al., 2006). همچنین بر اساس نتایج به‌دست آمده از جدول ۳، روند افزایشی میزان الکل باقی مانده با افزایش غلظت سولفات پتاسیم مشاهده شد. به نظر می‌رسد که سولفات پتاسیم یک عامل محدودکننده رشد مخمر و باکتری استوباکتر در محیط بوده و باعث کاهش راندمان تبدیل الکل به اسید استیک شده است. غلظت‌های معینی از سولفات پتاسیم باعث تغییر شرایط محیط از حالت هوازی به بی‌هوازی شده است، و رشد و فعالیت استوباکتر که یک باکتری هوازی اجباری است را کند و یا متوقف کرده است (Gorji et al., 2007). اثرات متقابل غلظت مخمر و فسفات آمونیوم و محتوی فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم نیز کاهش معنی‌دار محتوی الکل باقی مانده در محصول را نشان می دهند (شکل ۱- ی، ۱- ح). در مجموع اثر متقابل سولفات پتاسیم با سایر متغیرها و همچنین مقادیر متوسط آن بر میزان الکل باقی مانده در محصول مثبت ارزیابی گردید. محققان بر این باورند که کاهش غلظت الکل باقی مانده در محیط با افزایش غلظت اسید (راندمان تولید اسید و افزایش اسیدیته) همراه است (Maris et al., 2006). نتایج برخی از مطالعات قبلی نیز مؤید این مطلب می‌باشد. به‌طور مثال، Sarkar و Das (۲۰۱۷)، اذعان داشتند که غنی‌سازی محیط کشت تخمیر با آمونیوم نیترات و آمونیوم سولفات موجب افزایش راندمان تولید اسید سیتریک نسبت به نمونه شاهد (حاوی ۱۵ گرم سوکروز) می‌شود. اما افزایش غلظت آمونیوم نیترات و آمونیوم سولفات از ۰/۲۵٪ تا ۱٪ راندمان تولید اسید را کاهش می‌دهد (Sarkar and Das, 2017). همچنین نتایج آنها نشان داد که با افزایش غلظت قند گلوکز و سوکروز از ۵٪ تا ۱۵٪ راندمان تولید اسید سیتریک افزایش می‌یابد و قند سوکروز نسبت به گلوکز در افزایش راندمان تولید اسید تأثیر بیشتری دارد.

تغییرات اندیس اکسیداسیون

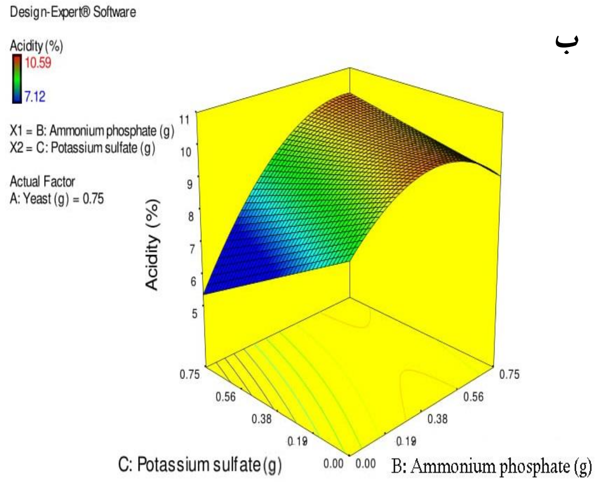
نتایج حاصل از جدول ۲ نشان می‌دهد که مدل خطی به‌دست آمده از تغییرات اندیس اکسیداسیون در تیمارهای مختلف معنی‌دار ارزیابی شد (P<0.001).

اثرات متقابل برخی از متغیرهای مورد بررسی نیز در سطح احتمال ۹۵ و ۹۹ درصد معنی‌دار بودند که نشان‌دهنده تأثیر توأم متغیرهای مستقل بر تغییرات اندیس اکسیداسیون می‌باشد. بر اساس نتایج به‌دست آمده از جدول ۳ مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت مخمر و فسفات آمونیوم، اندیس اکسیداسیون به حداکثر مقدار خود می‌رسد که دلیل این مشاهده را می‌توان به غنی شدن محیط از مواد مغذی مورد نیاز برای رشد و فعالیت مخمر و باکتری استوباکتر نسبت داد که این امر به نوبه خود منجر به افزایش شدید فعالیت مخمر و استوباکتر و در نتیجه اسید استیک حاصل از آن می‌شود (Plessi, 2003). با توجه به نتایج جدول ۳، افزایش غلظت سولفات پتاسیم به‌دلیل اثر محدودکنندگی رشد مخمر و باکتری، ممانعت از تخمیر کامل قندها و طولانی شدن زمان تخمیر باعث کاهش اندیس اکسیداسیون تیمارها گردید (Ataye Salehi., 2010). همچنین به نظر می‌رسد که غلظت‌های مشخص سولفات پتاسیم به واسطه برهمکنش با یون‌های فلزی خصوصا آهن و منیزیم، باعث ایجاد اختلال در فرایند تخمیری تولید اسید استیک می‌شود (Rashidi and Mazaheri Asadi 2008). اثر متقابل غلظت مخمر و فسفات آمونیوم در مقادیر بالا در افزایش اندیس اکسیداسیون تیمارها مثبت و معنی‌دار ارزیابی شد (شکل ۱- ط).

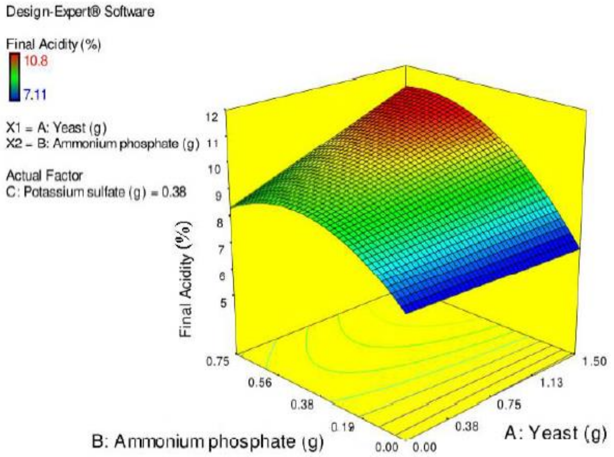
الف



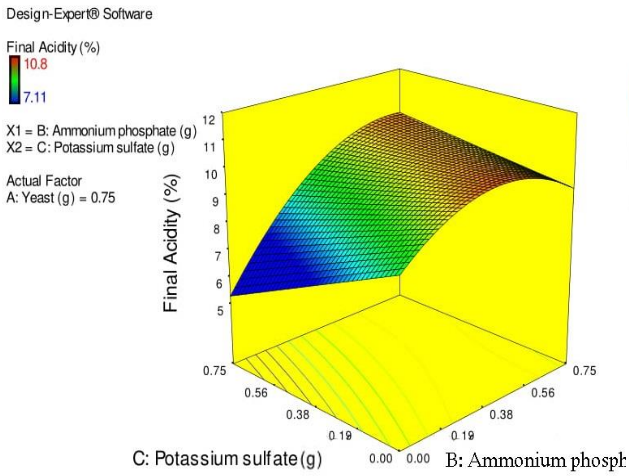
ب



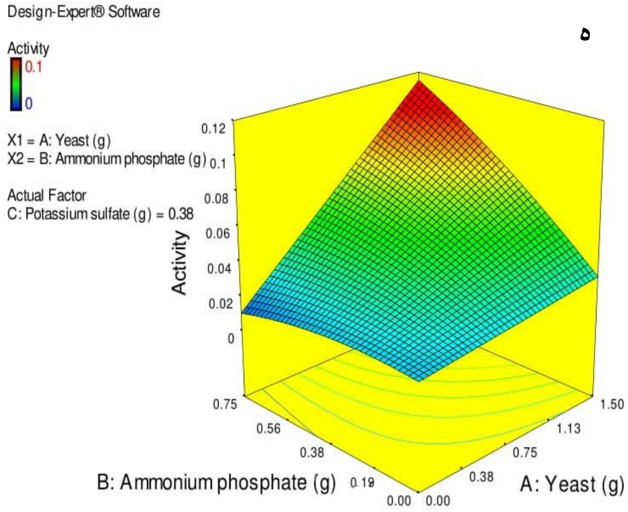
ج



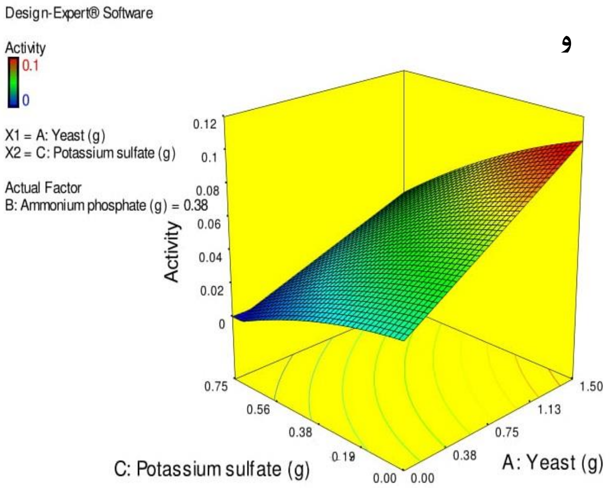
د



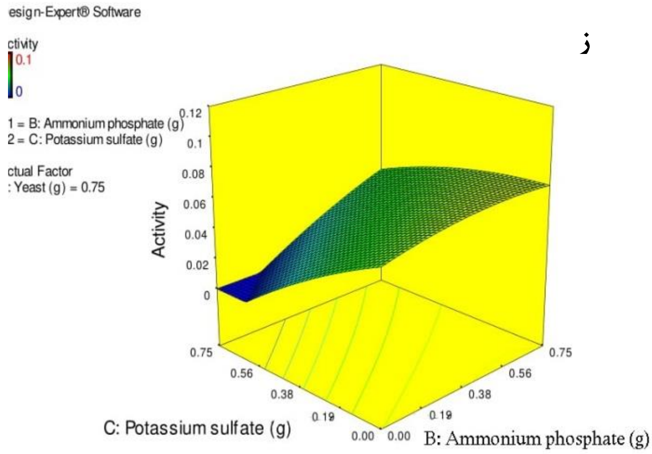
ه


Design-Expert® Software
Activity
0.1
0
X1 = A: Yeast (g)
X2 = B: Ammonium phosphate (g)
Actual Factor
C: Potassium sulfate (g) = 0.38
Activity
B: Ammonium phosphate (g)
A: Yeast (g)

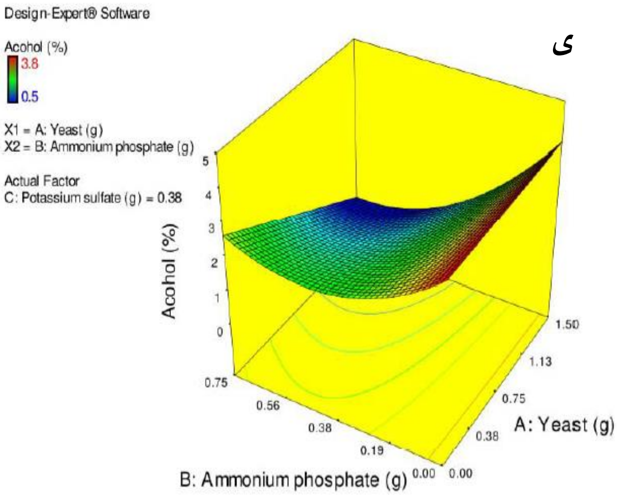
و


Design-Expert® Software
Activity
0.1
0
X1 = A: Yeast (g)
X2 = C: Potassium sulfate (g)
Actual Factor
B: Ammonium phosphate (g) = 0.38
Activity
C: Potassium sulfate (g)
A: Yeast (g)

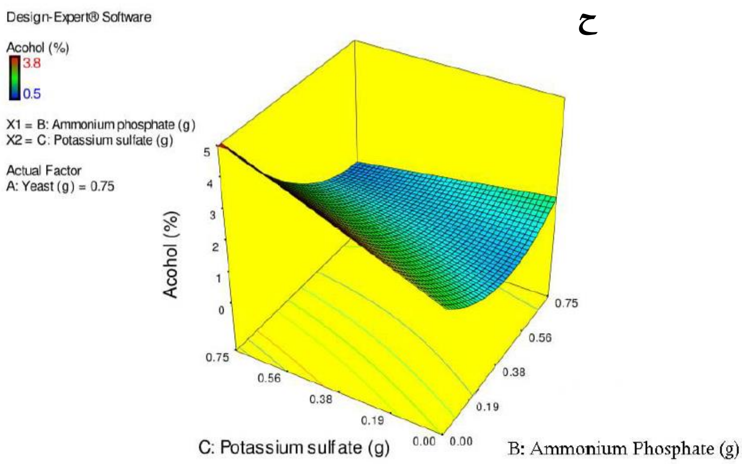
ز


esign-Expert® Software
ctivity
0.1
0
1 = B: Ammonium phosphate (g)
2 = C: Potassium sulfate (g)
ctual Factor
: Yeast (g) = 0.75
Activity
C: Potassium sulfate (g)
B: Ammonium phosphate (g)

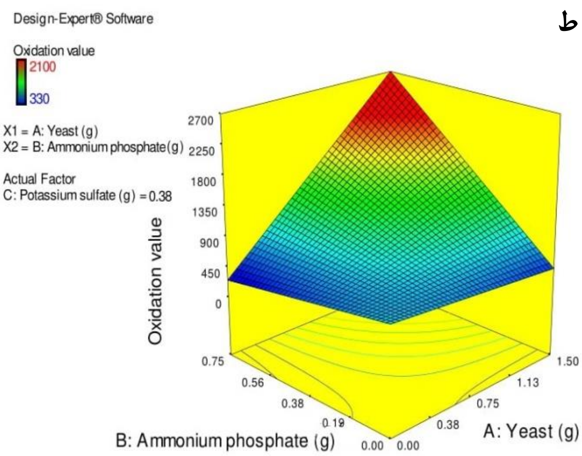
ی


Design-Expert® Software
Acohol (%)
3.8
0.5
X1 = A: Yeast (g)
X2 = B: Ammonium phosphate (g)
Actual Factor
C: Potassium sulfate (g) = 0.38
Acohol (%)
B: Ammonium phosphate (g)
A: Yeast (g)

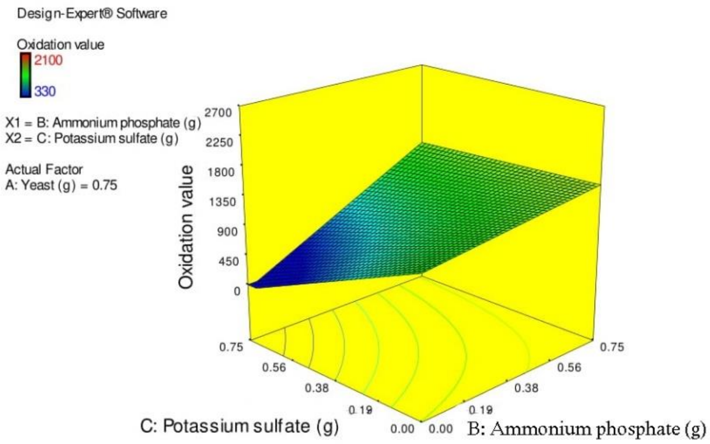
ح


Design-Expert® Software
Acohol (%)
3.8
0.5
X1 = B: Ammonium phosphate (g)
X2 = C: Potassium sulfate (g)
Actual Factor
A: Yeast (g) = 0.75
Acohol (%)
C: Potassium sulfate (g)
B: Ammonium Phosphate (g)

ط


Design-Expert® Software
Oxidation value
2100
330
X1 = A: Yeast (g)
X2 = B: Ammonium phosphate (g)
Actual Factor
C: Potassium sulfate (g) = 0.38
Oxidation value
B: Ammonium phosphate (g)
A: Yeast (g)

ق



شکل ۱- اثر متقابل متغیرهای مستقل بر تغییرات ویژگی‌های کیفی اسید استیک

Fig. 1. The interaction effect of independent variables on quality characteristics of acetic acid

شکل (۱- ق) نیز نشان می‌دهد که اثر متقابل غلظت فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم در مقادیر بالا افزایش اندیس اکسیداسیون را به دنبال داشت. باید تذکر داشت که اثر متقابل سولفات پتاسیم با سایر متغیرها و همچنین مقادیر متوسط آن بر اندیس اکسیداسیون محصول مثبت به‌دست آمد. نتایج مطالعه Alben و Erkmen (۲۰۰۴)، در رابطه با تأثیر غلظت‌های مختلف آمونیوم نیترات بر راندمان تولید اسید سیتریک نشان داد که با افزایش غلظت آمونیوم نیترات راندمانو تولید اسید سیتریک افزایش می‌یابد، و همچنین سرعت تولید اسید سیتریک طی ۴ روز (فاز اول تولید) را به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد. از آنجایی که نیتروژن یک عامل محدودکننده در فرایند تخمیر اسید سیتریک است، تأثیر نیتروژن از طریق آمونیوم نیترات به‌دلیل متابولیزه شدن کامل آن طی فرایند تخمیر اثر به‌سزایی در افزایش راندمان تولید اسید سیتریک دارد (Alben and Erkmen, 2004).

بهینه‌سازی فرمول و اعتبارسنجی

پس از مدل‌سازی متغیرهای کیفی موردنظر، تعیین شرایط بهینه متغیرهای مستقل به‌منظور دستیابی به ماکزیمم مقدار اسیدیته اولیه، اسیدیته نهایی، فعالیت و اندیس اکسیداسیون و مینیمم مقدار الکل باقی مانده در محصول انجام گرفت. شرایط بهینه فرایند شامل ۱/۵ گرم مخمر، ۰/۷۵ گرم فسفات آمونیوم و ۰/۳۸ گرم سولفات پتاسیم در مرحله تولید تعیین گردید. به‌منظور اعتبارسنجی مدل‌های حاصل، نمونه بهینه تهیه و درصد خطای هر یک از پارامترهای کیفی مورد نظر با استفاده از رابطه ۴ محاسبه گردید. نتایج ویژگی‌های کیفی نمونه تهیه شده در شرایط آزمایشگاهی و پیش‌بینی شده توسط مدل و درصد خطای برآورد هر ویژگی در جدول ۴ آورده شده است. تفاوت اندک میان نتایج ارزیابی شده و پیش‌بینی شده و همچنین درصد خطای محاسبه شده بیانگر صحت عملکرد مدل‌های حاصل است.

(۴) عدد واقعی/ (عدد پیش‌بینی شده− عدد واقعی)= درصد خطا

جدول ٤- بررسی صحت پیش‌بینی مدل‌های حاصل شده با استفاده از روش سطح پاسخ در پیش‌بینی فاکتورهای کیفی اسید استیک

Table 4- Prediction accuracy of the response surface models in predicting the quality characteristics of acetic acid

Percentage error درصد خطا	Predicted amount مقدار پیش‌بینی شده	Empirical value مقدار تجربی	Test آزمون
0.365	10.91	10.95	**Initial acidity اسیدیته اولیه**
0.267	11.22	11.25	**Final acidity اسیدیته نهایی**
10.00	0.11	0.10	**Activity فعالیت**
0.00	0.05	0.05	**Residual alcohol الکل باقی مانده**
7.13	2699.87	2529.00	**Oxidation index اندیس اکسیداسیون**

مقایسه ویژگی‌های کیفی نمونه بهینه و شاهد

در پژوهش حاضر، پارامترهای کیفی (اسیدیته اولیه و نهایی، فعالیت، الکل باقی مانده، اندیس اکسیداسیون) نمونه بهینه با دو نمونه شامل نمونه شاهد (صفر گرم مخمر، صفر گرم فسفات آمونیوم، صفر گرم سولفات پتاسیم)، و نمونه حاوی ترکیب فعال کننده‌ای تجاری به نام آستازوم که استفاده آن در صنعت رایج است مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت که نتایج آنها در جدول ۵ آورده شده است.

جدول ۵- مقایسه نمونه بهینه با نمونه شاهد و نمونه حاوی آستازوم

Table 5- Comparison in the optimal sample with the control and the sample containing Astasom

Oxidation index اندیس اکسیداسیون	Residual alcohol الکل باقی مانده	Activity فعالیت	Final acidity اسیدیته نهایی	Initial acidity اسیدیته اولیه	Samples نمونه‌ها
2520± 9[ab]	0.05± 0.002[b]	0.1± 0.03[ab]	11.25± 0.45[a]	10.95± 0.12[a]	**Optimum** **بهینه**
2630± 7[a]	0.02± 0.005[b]	0.15± 0.02[a]	11.28± 0.33[a]	10.82± 0.24[a]	**Sample containing Astasom** **نمونه حاوی آستازوم**
330± 5[c]	40± 0.23[a]	0± 0.00[c]	7.3± 0.59[b]	7.3± 0.67[b]	**Control** **شاهد**

جدول ٦- مقایسه ویژگی‌های کیفی نمونه بهینه و شاهد

Table 6- Comparison in the qualitative characteristics of the optimal and the control samples

Samples نمونه‌ها: Control شاهد	Samples نمونه‌ها: Optimum بهینه	Qualitative parameters پارامترهای کیفی
0.185± 0.02[a]	0.10± 0.00[b]	**Insoluble solids** **مواد جامد نامحلول (g/100ml)**
4.50± 0.70[a]	5.00± 0.00[a]	**Ascorbic acid** **اسید آسکوربیک (mg/100g)**
1.95± 0.07[b]	6.05± 0.07[a]	**Total phenol** **فنول کل (mg/L)**
0.045± 0.007[a]	0.05± 0.00[a]	**Rejuvenation sugar** **قند احیاء (g/100g)**
8.87± 0.28[a]	6.25± 0.21[b]	**Sulfur dioxide** **دی اکسید گوگرد (mg/kg)**
0.0095± 0.001[a]	0.0095± 0.001[a]	**Arsenic** **آرسنیک (mg/kg)**
0.0095± 0.001[a]	0.0075± 0.004[b]	**pb** **سرب (mg/kg)**
0.87± 0.01[a]	0.45± 0.07[b]	**Zn** **روی (mg/kg)**
0.50± 0.00[a]	0.225± 0.04[b]	**Cu** **مس (mg/kg)**
1.16± 0.02[a]	1.095± 0.03[a]	**Fe** **آهن (mg/kg)**

در هر ردیف، میانگین‌های دارای حروف متفاوت، از لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار با هم دارند ($p<0.05$).

Averages with different letters in rows are different statistically ($p<0.05$)

همانطور که نتایج جدول ۵ نشان می‌دهد اسیدیته اولیه، اسیدیته نهایی، فعالیت و اندیس اکسیداسیون در نمونه بهینه به‌طور معنی‌داری بالاتر و میزان الکل باقی مانده کمتر از نمونه شاهد است (p<۰/۰۵). بنا بر نتایج حاصل و با توجه به حد قابل قبول تعیین شده برای

پارامترهای فوق الذکر که برای میزان الکل باقی مانده حداکثر ۰/۵٪ و برای اندیس اکسیداسیون ۳۰۰۰–۷۰۰ در نظر گرفته شده است (استاندارد ملی ایران، ۱۳۹۴)، می‌توان گفت که نمونه شاهد نمونه مطلوب و مناسبی از نظر صنعت نیست و درواقع نیاز به فعال‌کننده برای انجام مطلوب فرایند ضرورت دارد. لذا، فعال کننده‌ای به نام آستازوم که ترکیبات تشکیل‌دهنده آن مشخص نشده است در حد توصیه شده در صنعت به نمونه شاهد (۱/۵ گرم به ازای ۳۰۰۰ میلی‌لیتر مش) اضافه گردید و ویژگی‌های کیفی محصول تولیدی با نمونه بهینه مورد مقایسه قرار گرفت. از آنجایی که نمونه بهینه از نظر پارامترهای کیفی صنعتی با نمونه حاوی آستازوم تفاوت چشمگیری را نشان نداد ($p>0/05$)، نمونه حاوی آستازوم جهت ارزیابی‌های کیفی بیشتر و مقایسه با نمونه بهینه مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج حاصل از بررسی برخی ویژگی‌های کیفی نمونه بهینه و شاهد (نمونه حاوی ترکیب فعال‌کننده آستازوم) نشان داد که نمونه بهینه و نمونه شاهد از نظر میزان اسید آسکوربیک و قند احیاء تفاوت معنی-داری با یکدیگر ندارند ($p>0/05$). با توجه به نتایج به‌دست آمده از مقایسه محتوی فنول کل نمونه بهینه و شاهد می‌توان گفت که محتوی فنول کل نمونه بهینه به‌طور قابل توجهی بالاتر از نمونه شاهد است ($p<0/05$). این افزایش محتوی ترکیبات فنولیک در نمونه بهینه را می‌توان به استفاده از مواد مغذی و وجود منابع نیتروژن و پتاسیم که مکمل غذایی برای رشد و فعالیت بیشتر مخمر محسوب می‌شوند، و همچنین سنتز متابولیت‌های ثانویه توسط استوباکتر ناشی از حضور این مواد مغذی در محیط در حین فرایند تولید اسید استیک نسبت داد (Maris et al., 2006). کاهش میزان مواد جامد نامحلول در نمونه بهینه نسبت به نمونه شاهد به افزایش فعالیت مخمر و باکتری، مصرف بیشتر ترکیبات قندی توسط مخمر و تبدیل بیشتر اتانول به اسید استیک در نمونه بهینه مرتبط است (Plessi, 2003). بر طبق نتایج جدول ۶، نمونه بهینه از میزان دی‌اکسید گوگرد کمتری نسبت به نمونه شاهد برخوردار است ($p<0/05$)، همچنین میزان سرب، روی و مس در نمونه بهینه نسبت به نمونه شاهد کاهش چشمگیری را نشان می‌دهد ($p<0/05$). این مشاهدات به فعالیت شلاته‌کنندگی فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم در حضور کاتیون‌ها (Gorji et al., 2007) و وجود ناخاصی‌های موجود در آستازوم مربوط می‌شود.

نتیجه‌گیری

تولید اسید استیک در فرمانتور ناپیوسته تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند نوع و غلظت مخمر، pH، دما، غلظت اکسیژن و مواد مغذی محیط کشت قرار می‌گیرد. در این مطالعه اثر غلظت مخمر، غلظت فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم با هدف افزایش راندمان تولید اسید استیک توسط استوباکتر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که فسفات آمونیوم به‌عنوان یک ماده مغذی مکمل باعث افزایش رشد مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* و باکتری استوباکتر و در نتیجه تولید بیشتر اسید استیک می‌گردد. استفاده از غلظت‌های بالاتر مخمر نیز تأثیر مطلوبی در افزایش راندمان تولید اسید استیک دارد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، افزایش غلظت مخمر و فسفات آمونیوم باعث افزایش اسیدیته، فعالیت و اندیس اکسیداسیون و کاهش میزان الکل باقی مانده می‌شود، درحالیکه سطوح بالای غلظت سولفات پتاسیم موجب کاهش اسیدیته، فعالیت و اندیس اکسیداسیون محصول می‌گردد. هرچند استفاده از سطوح متوسط آن در بهبود ویژگی‌های کیفی محصول مؤثر است. سطوح بهینه متغیرهای مستقل این پژوهش، استفاده از ۱/۵ گرم مخمر، ۰/۷۵ گرم فسفات آمونیوم و ۰/۳۸ گرم سولفات پتاسیم به دست می‌آید. نمونه بهینه تولیدی در مقایسه با نمونه شاهد دارای فعال کننده تجاری آستازوم داری مواد جامد نامحلول، دی‌اکسید گوگرد، سرب، روی و مس کمتر و محتوی فنول کل بالاتر است ($p<0/05$).

تشکر و قدردانی

از شرکت تاکستان زاینده رود (سرکه سارینا) به‌دلیل همکاری‌های اجرایی در راستای محقق شدن این تحقیق کمال تشکر را داریم.

منابع

1. AACC. (2000). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. 10th ed. Vol 2. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN; 2000: 02-31.01.
2. Abdolalizadeh, M. S., Vasheghani- Farahani, E., Khodabandeh, M., and Hashemi- Najafabadi, S. (2010). Optimization of Lactic Acid Production Conditions in Batch Fermentation of Whey by *Lactobacillus casei. Food Science and Technology (JFST)*, 7 (2), 96-102.
3. Adachi, O., and Yakushi, T. (2016). Membrane-bound dehydrogenases of acetic acid bacteria. In: Matsushita, K., Toyama, H., Tonouchi, N., and Okamoto-Kainuma, A. editors. Acetic acid bacteria: Ecology and physiology. Tokyo: Springer Japan, pp. 273-97. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55933-7_13

4. Aguilar Uscanga, M. G., Escudero Abarca, B. I., Rodriguez, J. G., and Garcia, R. C. (2006). Carbon sources and their effect on growth, acetic acid and ethanol production by *brettanomyces bruxellensis* in batch culture. *Journal of food process Engineering*, 30 (1), 13-23. https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2007.00097.x
5. Alben, E., and Erkmen, O. (2004). Production of Citric Acid from a New Substrate, Undersized Semolina, by *Aspergillus niger. Food Technol. Biotechnol.* 42 (1), 19–22.
6. AOAC. (2002), Official Methods ofAnalysis of AOAC International, 17th Edn., AOAC International, Maryland.
7. Ataye Salehi, E., Haddad Khodaparast, M. H., Lame, S. H., Habibi Najafi, M. B., and Fatemi, S. H. (2010). Utilization of Date Seed Powder as Supplementary Nutrient in the Alcoholic Fermentation of Cider Vinegar Production. *Food Technology and Nutrition*, 7 (3), 28-34.
8. Awad, H. M., Diaz, R., Malek, R. A., Othman, N. Z., Aziz, R. A., and EL Enshasy, H. A. (2012). Efficient Production Process for Food Grade Acetic Acid by *Acetobacter aceti* in Shake Flask and in Bioreactor Cultures. *E-Journal of Chemistry*, 9 (4), 2275-2286.
9. Balali-Mood, M., Riahi-Zanjani, B., Mahdizadeh, A., Moradi, V., and Fazeli-Bakhtiyari, R. (2018). Arsenic and Lead Contaminations in Commercial Fruit Juices of Markets in Mashhad, Iran. *Iranian Journal of Toxicology*, 12, 16-20.
10. Budak, N. H., Aykin, E., Seydim, A.C., Greene, A. K., and Seydim, Z. B. G. (2014). Functional properties of vinegar. *Journal of Food Science*, 79, 757–764.
11. Cevrimli, B. S., Kariptas, E., and Ciftci, H. (2009). Effects of Fermentation Conditions on Citric Acid Production from Beet Molasses by *Aspergillus niger. Asian Journal of Chemistry*, 21 (4), 3211-3218.
12. Dahdouh, L., Wisniewski, C., Ricci, J., Vachoud, L., Dornier, M., and Delalonde, M. (2016). Rheological study of orange juices for a better knowledge of their suspended solids interactions at low and high concentration. *Journal of Food Engineering*, 174, 15-20. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.11.008
13. Ding S., and Tan, T. (2006). L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochemistry*, 41, 1451-1454. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.01.014
14. Gorji, M. A., Nahvi Emtiazi, G., and Bidram, H. 2007. The study of effective factors in improving the fermentation yield of wheat starch. *Pajouhesh and Sazandegi*, 74, 79- 89.
15. Hafzan, Y., Saw, J. W. and Fadzilah, I. (2017). Physicochemical properties, total phenolic content, and antioxidant capacity of homemade and commercial date (*Phoenix dactylifera* L.) vinegar. *International Food Research Journal*, 24 (6), 2557- 2562.
16. Haq, I., Ali, S., Qadeer, M., and Iqbal, J. (2002). Effect of copper ions on mould morphology and citric acid productivity by *Aspergillus niger* using molasses based media. *Process Biochem*, 37, 1085-1090. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00322-3
17. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Liquid fruit and vegetable products determination of sulphur dioxide content. ISIRI no 4308. 1st ed.; 2017.
18. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Spice and condiment– Vinegar– Test methods. ISIRI no 1394. 1st ed.; 2003.
19. Joshi, V. K., Yadav, J., Sharma, R., Joshi, D., and Gupta, R. K. (2016). Effect of Nutrients and Growth Stimulators on Acetic Acid Fermentation using Natural Consortia. *International Journal of Food Fermentation Technology*, 6 (1), 81-95.
20. Maris, A. J. A., Abbott, D. A., Bellissimi, E., Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M. A. H., and Pronk, J. T. (2006). Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae: Current status. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90, 391–418. https://doi.org/10.1007/s10482-006-9085-7
21. Mazaheri Asadi, M., and Nikkhah Maman, M. (2003). Investigation of citric acid production from date waste using *Aspergillus niger*. *Medical scholar*, 11 (47), 57-66.
22. Nadeem, A., Jafri, S. A., Baig, S., Irfan, M., and Syed, Q. (2017). Optimization of Substrate Concentration for Enhanced Citric Acid Production using *Aspergillus niger* M-101. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 52 (5), 275- 277.
23. Nascimento, R. A. d. A., Ferretti, L. P., and Gonçalves, A. R. (2005). Determination of Organic Acids and Ethanol in Commercial Vinegars. *Brazilian Journal* of *Food Technology*, 5, 51-6.
24. Ozturk, I., Caliskan, O., Tornuk, F., Ozcan, N., Yalcin, H., Baslar, M., and Sagdic, O. (2015). Antioxidant, antimicrobial, mineral, volatile, physicochemical and microbiological characteristics of traditional home-made Turkish vinegars. *LWT– Food Science and Technology*, 63, 144–151. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.003
25. Plessi, M. (2003). Vinegar. In Encyclopedia of food Science and nutrition leds B Caballero, Trugo, L.C., and Finge, P. M. Oxford. Academic press. PP. 5996-6003.
26. Pooja, S., and Soumitra, B. (2013). Optimization of process parameters for vinegar production using banana fermentation. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 2, 501–514.

27. Rao, P. R., and Reddy, M. K. (2013). Production of Citric Acid by *Aspergillus Niger* Using Oat Bran as Substrate. *International Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 3 (3), 181-190.
28. Rashidi, H., and Mazaheri Asadi, M. (2008). Optimization of conditions for citric acid production from date waste using liquid phase method. *Microbiological knowledge*, 1 (1), 1-11.
29. Robert, W. H. (2006). Microbiology and technology of fermented foods. Blackwell publishing. pp. 397-417.
30. Rosada, K. K. (2018). Enhanced acetic acid production from manalagi apple (*Malus sylvestris* mill) by mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti* in submerged fermentation. *Journal of Physics: Conference Series*, 1013, 1-7.
31. Sarkar, D., and Das, K. (2017). Optimization of citric acid production from *aspergillus niger* using pineapple waste as feedstock in submerged fermentation. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 6 (17), 810-818.
32. Sharifi, M., Saeedi Asl, M. R., Haddad Khodaparast, M. H., Jahed, E., Abedinia, A. R., and Sardarian, A. (2015). The investigation of stimulating effects of Kbkab and Mrdasng palm seed powder on Saccharomyces cerevisiae in the apple cider vinegar production. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 6 (22), 10-18.
33. Zhang, H., Li, J., Zhang, Q., Zhu, S., Yang, S., and Zhang, Z. (2020). Effect of Substrate Concentration on Photo-Fermentation Bio-Hydrogen Production Process from Starch-Rich Agricultural Leftovers under Oscillation. *Sustainability*, 12, 1-8.